

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

ZUM ATP-GEHALT IM MENSCHLICHEN SPEICHEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Matthias Hein
aus München

1981 #334

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

ZUM ATP-GEHALT IM MENSCHLICHEN SPEICHEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Matthias Hein
aus Münchberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.1981

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	2
II. Problemstellung	4
III. Literaturübersicht	5
IV. Material und Methode	14
A. Speichel	14
B. Speichelprobenentnahme	14
1. Gemischter Speichel	14
2. Parotisspeichel	15
3. Submandibularisspeichel	16
C. Vorbereitung und Messung	17
1. Gemischter Speichel	17
2. Steriles Filtrat	18
3. Parotisspeichel	18
4. Submandibularisspeichel	18
5. Verwendete Reagenzien	19
6. Verwendete Geräte	21
D. Grundlagen der Biolumineszenzmessung	21
E. Berechnung der Meßergebnisse	23
F. Vorversuche	25
1. Homogenisierung	25
2. Verdünnung	26
3. Lagerung des Speichels	28
4. Kühlung der Rundküvetten	28
V. Ergebnisse und Diskussion	30
VI. Zusammenfassung	42
VII. Literatur	43
VIII. Anhang	46

I. EINLEITUNG

Für die Behandlung der Volkskrankheit Karies und deren Folgeschäden müssen von den gesetzlichen Krankenkassen allein in der Bundesrepublik Deutschland jährlich Summen in Milliardenhöhe aufgebracht werden. Ganz abgesehen von den erheblichen finanziellen Belastungen, die diese Kosten für den einzelnen Bürger mit sich bringen, zeigen solche Beträge überdeutlich, wie groß die Zahnschäden durch Karies sind. Das gilt es in Zukunft mit geeigneten Vorbeugemaßnahmen zu verhindern. Deshalb sind umfangreiche Forschungsarbeiten notwendig, die uns die Zusammenhänge der Kariesentstehung erkennen und die richtigen Gegenmaßnahmen finden lassen. In den letzten Jahren wurde darum auch auf den Gebieten der Speichelsekretion, der Speichelzusammensetzung und den Aufgaben der Bestandteile, vor allem aber der Veränderungen bei kariesanfälligen Personen – gegenüber nicht anfälligen – viel geforscht. Denn im Zusammenhang mit der Entstehung von Zahnkaries kommt dem Speichel neben vielen anderen Faktoren, wie z.B. Plaque, Ernährung, Beschaffenheit der Zahnhartsubstanzen und Mundhygiene, eine ganz besondere Bedeutung zu. Schon 1913 sagte PICKERILL: „Seit Jahren gilt es als feststehend, daß Menge und Zusammensetzung des Speichels die Zähne beeinflussen.“

Es steht bereits fest, daß Kohlenhydrate, wie z.B. Glukose und Maltose, und Mikroorganismen die wichtigste Rolle bei der Kariesentstehung spielen, da Kohlenhydrate von Bakterien zu zahnschädigenden Säuren abgebaut werden. Deshalb ist bei ständiger Anwesenheit dieser Substrate ein höherer Kariesbefall zu erwarten. BRAMSTEDT und Mitarbeiter (1954) konnten feststellen, daß der Speichel kariesanfälliger Personen Glukose langsamer abbaut und damit eine längere Verweildauer dieser Substanz im Munde gegeben ist. KRÖNCKE (1959) wies im gemischten Nüchternspeichel von kariesanfälligen Versuchspersonen Maltose und Glukose papierchromatographisch nach. Bei Kariesresistenten war das nicht

möglich. Auch dies deutet auf eine verminderte Abbaugeschwindigkeit von Kohlenhydraten hin.

Daneben war auch der Phosphatgehalt des Speichels immer wieder Gegenstand von Untersuchungen. „Die Tatsache, daß Phosphat wesentlich am Aufbau des Schmelzes beteiligt ist, und die Annahme von Wechselbeziehungen zwischen Zahnoberfläche und Speichel führte schon früh zu der Vermutung, daß dem Speichelphosphat eine wesentliche Rolle im Kariesgeschehen zukommen müsse. Speichelphosphatuntersuchungen gehören deshalb zu den frühesten experimentellen Arbeiten der modernen Kariesforschung“ (AHRENS, 1969).

Diese Untersuchungen lassen sich jetzt durch die Entwicklung einer neuen Technik zur Messung des Adenosintriphosphates = ATP weiterführen. Immerhin ist es denkbar, daß freies ATP ein kariogener Faktor ist. „Die Adenosintriphosphorsäure hat ein großes Komplexbindungs- und -Lösungsvermögen gegenüber Schmelzkalzium, und zwar bei neutralem pH. Dies darf in Beziehung zur Kariesfrage nicht außer acht gelassen werden“ (EGGERS LURA, 1961).

ATP spielt aber nicht nur allein in diesem Zusammenhang eine Rolle. Bei Forschungsarbeiten, die den Kohlenhydratabbau im Speichel, die Atmung des Speichels, oder einfach die Suche nach gefäßwirksamen Substanzen im Speichel betreffen, ist das ATP auch von Bedeutung. „Die Adenosintriphosphorsäure ist ein Überträger von Energie, Phosphat und Molekülgruppen bei den anaeroben (Glykolyse, Gärung) und aeroben (Atmung) Stoffwechselreaktionen und Synthesen und hat, wie andere Adenosinverbindungen, starke gefäßerweiternde Wirkung“ (ZETKIN/SCHALDACH, 1974).

II. PROBLEMSTELLUNG

Bisher ist von allen im menschlichen Speichel vorkommenden Phosphaten hauptsächlich das anorganische Phosphat untersucht worden. Es macht den größten Anteil am Gesamtphosphat aus. Dabei interessierte man sich besonders für die Schmelzlöslichkeit und eine mögliche Remineralisation des angegriffenen Schmelzes durch das im Speichel vorhandene anorganische Phosphat. Das Wissen über die enge Beziehung zwischen Kariesentstehung und dem mit Phosphorylierungsvorgängen gekoppelten Kohlenhydratabbau läßt es jetzt sinnvoll erscheinen, auch über die energiereichen Phosphate genaue Angaben zu bekommen. Unterschiede zwischen Kariesanfälligen und Kariesresistenten, wie sie schon in Bezug auf den Kohlenhydratabbau beobachtet werden konnten, sind bei den energiereichen Phosphaten ebenso denkbar. Dies betrifft vor allem das ATP, das im gesamten enzymgesteuerten Stoffwechselgeschehen der Zelle eine zentrale Stellung einnimmt. Da ATP nur intrazellulär gebildet werden kann, gilt es als besonderes Merkmal für die lebende Zelle. Der gemessene ATP-Gehalt läßt sich so auch als Maß für die Quantität von Mikroorganismen im Speichel verwenden.

Weil kaum Untersuchungen dieser Art durchgeführt wurden, insbesondere nicht über zellfreien Speichel, soll nun in der vorliegenden Arbeit versucht werden, mit Hilfe der Lumino-metrie, den ATP-Gehalt im menschlichen Speichel zu bestimmen. Weiterhin sollen dabei Veränderungen in der Menge, die sich tagsüber ergeben können, und die Herkunft des ATP geklärt werden. Deshalb ist eine Aufgliederung der Untersuchung nötig, in:

- Messungen von gemischtem Tagesspeichel,
- Messungen der tageszeitlichen Schwankungen,
- Messungen der einzelnen Speicheldrüsensekrete und im Zusammenhang damit auch des sterilen Filtrats von gemischtem Speichel.

III. LITERATURÜBERSICHT

Bevor es erstmals gelang, ATP im Speichel nachzuweisen, und der Versuch gemacht werden konnte, Unterschiede zwischen verschiedenen Personengruppen herauszufinden, mußte eine lange Entwicklung durchlaufen werden, die bei einfachen Phosphatmessungen begann. Mit zunehmendem Wissensstand wurden die Meßmethoden immer wieder verbessert und die Aufgabenstellungen geändert. Zu Beginn dieses Kapitels muß deshalb schon gesagt werden, daß sich die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zum Teil recht erheblich voneinander unterscheiden. AHRENS (1961) teilte die Hauptursachen dafür folgendermaßen ein:

- Mangelnde Standardisierung bei der Speichelprobenentnahme
- Ungenaue Klassifizierung der Probanden in Kariesanfällige und Kariesresistente
- Ungeeignete Methoden der Phosphatbestimmung

Die ersten Arbeiten beschäftigten sich mit groben allgemeinen Bestandsaufnahmen des Phosphats, das man zunächst nur in eine anorganische und eine organische Fraktion aufteilte. ENTIN und GEIKIN (1928) fanden im Speichel von 12 „klinisch gesunden Individuen“ im Durchschnitt 11,59 mg% anorganisches und 2,41 mg% organisches Phosphat. Bei allen Untersuchungen ergab sich für die beiden Anteile ein Verhältnis von etwa 5:1. YOUNGBURG (1932) stellte dagegen in 20 Analysen 19,32 mg% Gesamtphosphat, 18,54 mg% anorganisches und 0,78 mg% organisches Phosphat fest. MATHIS (1934) schlüsselte seine gemessenen 12,84 mg% Gesamtphosphor in 12,80 mg% säurelöslichen und 12,26 mg% anorganischen Phosphor auf.

EGGERS LURA befaßte sich in zahlreichen Arbeiten genauer

mit der Materie. Es gelang ihm, die Phosphatverbindungen besser voneinander zu trennen. 1947 veröffentlichte er folgende Mittelwerte, die er im morgendlichen Ruhespeichel bei kariesresistenten Personen fand:

Gesamtphosphat	20,4 mg%
Anorganisches Phosphat	14,9 mg%
Totalorganisches Phosphat	5,5 mg%
Totalsäurelösliches Phosphat	19,8 mg%
Säurelösliches organisches Phosphat	4,9 mg%
Säureunlösliches organisches Phosphat	0,6 mg%

Er entwickelte seine Methode weiter und bereits 1949 gab er die nachstehend aufgeführten Mittelwerte heraus:

Total säurelösliches Phosphat	23,8 mg%
Unorganisches Phosphat	14,7 mg%
Kreatin-Phosphat	1,1 mg%
Adenosin-Phosphat	3,5 mg%
Hexose-Phosphat	2,1 mg%
Übrige organische Phosphatverbindungen	2,4 mg%

Diesen Werten lagen 35 Speichelanalysen von Knaben mit „verhärteter Karies“, also Karies sicca zugrunde. In dieser Arbeit wurde bewiesen, daß eine Änderung des Phosphatstoffwechsels durch einfache, phosphorreiche Ernährung zu einer Remineralisation der bereits durch Karies erweichten Zahnhartsubstanzen führen kann. Außerdem gelang es erstmals, die Adenosinphosphate aus der säurelöslichen organischen Phosphatfraktion herauszulösen und aufzuzeigen. Bereits in dieser Untersuchung findet sich der Hinweis, daß „jede Phosphorylierung von energetischen Prozessen begleitet ist“.

Als BRAMSTEDT und VONDERLINN (1952) feststellten, daß kariesanfällige Personen – gegenüber resistenten – eine niedrigere

Sauerstoffaufnahme im Speichel aufweisen, kamen sie zu der Überzeugung, daß sich dies entweder durch einen Mangel an anorganischem Phosphat, oder durch einen Mangel an Phosphat-akzeptoren für energiereiches Phosphat erklären ließe. In einer weiteren Forschungsarbeit konnten dann BRAMSTEDT, KRÖNCKE, NAUJOKS und VONDERLINN (1954) die Beziehung von ATP zur Atmung des Speichels belegen, indem sie durch Zugabe von ATP zum Nüchternspeichel von Kariesanfälligen und Karies-resistenten eine Änderung der Sauerstoffaufnahme und der Substratverbrennung (z.B. bei Glukose) bewirkten. Bei den letzteren konnte eine Abnahme der Atmung und geringe Steigerung des Kohlenhydratabbaus und bei anfälligen Personen eine Zunahme der Atmung und eine größere Steigerung der Verbrennung verzeichnet werden.

Diese Erkenntnisse nahm EGGERS LURA (1956) zum Anlaß, speziell labile Phosphatester darzustellen. Er bediente sich dabei einer papierchromatographischen Methode und kam zu dem Ergebnis, daß „der Speichel von normalen Personen erstaunlich große, präformierte Mengen von ATP enthalten muß“, wobei der ATP-Gehalt bei kariesresistenten Versuchspersonen – gegenüber kariesanfälligen – zu überwiegen schien. Außerdem fand er auch im Sekret der einzelnen Speicheldrüsen ATP. Allerdings überwog die ATP-Menge des gemischten Speichels im Vergleich zu der des reinen Parotisspeichels. Diese Untersuchungen ließen aber keine quantitativen Aussagen zu, weil zur Beurteilung nur Kontrollflecken aus reinen ATP-Proben herangezogen werden konnten.

Quantitative Angaben zum ATP-Gehalt machten NAUJOKS, BRAMSTEDT, KRÖNCKE und MARG (1958). Um den Einfluß von niedrigen Fluorkonzentrationen auf die energiereichen Phosphate AMP, ADP und ATP feststellen zu können, mußten sie zunächst die Werte unter Normalbedingungen finden. Verwendet wurde nur Nüchternspeichel von kariesresistenten = KR und kariesanfälligen = KA Testpersonen. Die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe einer enzymatischen Methode lieferte bei ATP fol-

gende Ergebnisse:

	KR μg/ml	KA μg/ml
ATP	0-50	0-217

Sie zeigen, daß der ATP-Gehalt beträchtlichen Schwankungen unterliegt.

Die prozentuale Verteilung der Nucleotide AMP, ADP und ATP veranschaulicht das deutliche Überwiegen der Adenosintri-phosphorsäure:

	ATP	ADP	AMP
KR	83%	9%	8%
KA	96%	2%	2%

Unter dem Einfluß niedriger Fluorkonzentrationen konnte „die Angleichung der Verhältnisse im KA-Speichel an die im KR-Speichel“ beobachtet werden.

AHRENS und RANKE (1961) führten die von EGGERS LURA begonnenen Untersuchungen fort. Um die Darstellung einiger organischer Phosphatverbindungen vervollständigen zu können, verwendeten sie die Säulenchromatographie (Abb. 1). Es wurden nur Nüchternspeichelproben von je 24 KA- und KR-Personen untersucht, die sofort nach dem Erwachen am Morgen gesammelt worden waren. Aus der säurelöslichen Fraktion wurde unter anderem auch das ATP herausgetrennt und mengenmäßig bestimmt (Abb. 2). Das Resultat läßt klar erkennen, daß bei KR eine größere Menge zu verzeichnen ist, was zwar mit

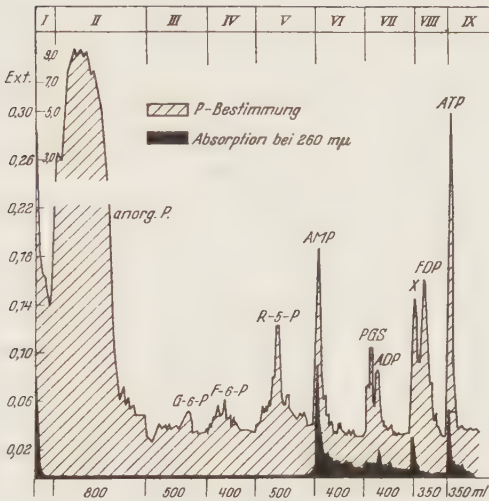


Abb. 1 Typisches Säulenchromatogramm der säurelöslichen organischen Phosphate des menschlichen Speichels (AHRENS und RANKE, 1961).

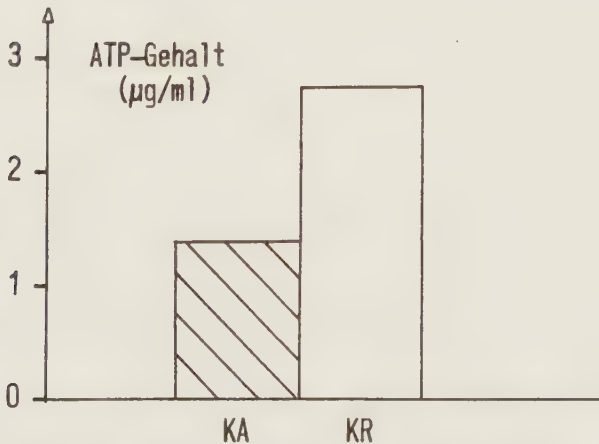


Abb. 2 Verhältnis des ATP-Gehalts zwischen KA und KR (AHRENS und RANKE, 1961).

den Angaben von EGGERS LURA übereinstimmt, aber im Gegensatz zu denen von NAUJOKS, BRAMSTEDT, KRÖNCKE und MARG steht. Der verlangsamte Glukoseumsatz bei kariesaktiven Probanden (siehe BRAMSTEDT, KRÖNCKE, NAUJOKS und VONDERLINN, 1954; KRÖNCKE, 1959) wurde aufgrund dieser Ergebnisse dem Mangel an energiereichem Phosphat zugeschrieben.

Noch im gleichen Jahr gab AHRENS (1961) eine weitere Arbeit zum Thema Phosphat und Karies heraus. Dabei stellte er sich die Aufgabe, einen Zusammenhang mit dem Sauerstoffverbrauch herzustellen. Er konnte bestätigen, daß die organische Phosphatfraktion, zu der auch die energiereichen Phosphate gehören, bei kariesresistenten Personen größer ist und diese Tatsache wohl mit der ebenfalls erhöhten Atmung in Beziehung zu setzen ist (siehe oben BRAMSTEDT, KRÖNCKE, NAUJOKS und VONDERLINN, 1954). Die Phosphatverbindungen wurden in eine anorganische, eine säurelösliche organische und eine säureunlösliche organische Fraktion aufgeteilt (Abb. 3).

Ein erneuter Hinweis auf die Adenosintriphosphorsäure findet sich in einer Untersuchung von AHRENS und BENEDICT (1968). Sie modifizierten die säulenchromatographische Methode zur Trennung der säurelöslichen organischen Phosphate und analysierten Nüchtern-, Tages- und Drüsenspeichel (Abb. 4). Das qualitative Bild der Chromatogramme von Tages- und Nüchternspeichel war stets gleich. Dasselbe ergab sich für das der verschiedenen Drüsensekrete. Allerdings fehlten bei diesen Darstellungen die Gipfel 4, 5, 8 und 9, was bedeutet, daß im Drüsenspeichel neben anderen Verbindungen auch kein ATP gefunden werden konnte. Dieses Ergebnis widerspricht dem von EGGERS LURA (siehe oben). Weiterhin wurde festgestellt, daß „der Gesamtposphatgehalt des Parotissekretes stets höher war, als der des vereinigten Sublingualis- Submandibularissekretes“.

In den darauf folgenden Jahren beschäftigte man sich nicht mehr mit der weiteren Auftrennung der Phosphatfraktionen und deren Messung. Die Möglichkeiten, der bis dahin ent-

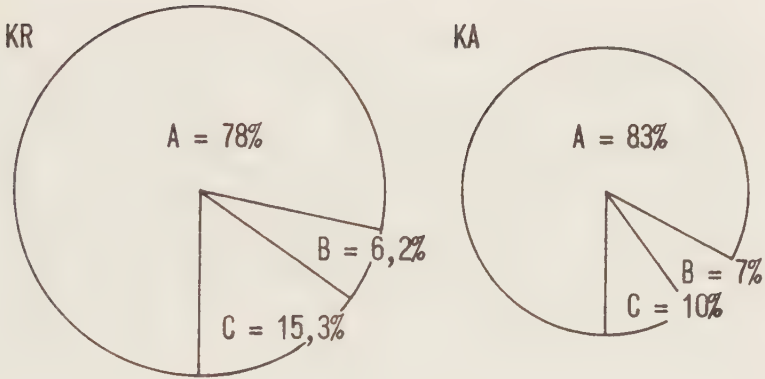


Abb. 3 Das prozentuale Verhältnis der Phosphatfraktionen im Speichel von Kariesresistenten und Kariesanfälligen nach AHRENS (1961). Die Kreisflächen veranschaulichen den unterschiedlichen Gesamtphosphatgehalt, der bei KR 48,3 mg% und bei KA 29,3 mg% betrug.

A = anorganische Fraktion

B = säurelösliche organische Fraktion

C = säureunlösliche organische Fraktion

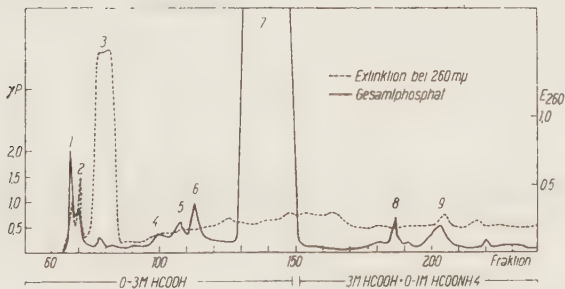


Abb. 4 Chromatogramm des Tagesspeichels (AHRENS und BENEDICT, 1968). Gipfel 9 = ATP und FDP.

wickelten Methoden, konnten auch als weitgehend ausgeschöpft gelten.

Dafür traten dann Untersuchungen über die tageszeitlichen Schwankungen, bzw. Schwankungen von Tag zu Tag in den Vordergrund. In diesem Zusammenhang wurden von AHRENS (1969) zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Die Abbildung 5 zeigt ein typisches Ergebnis dieser Forschungsarbeiten. Auffallend sind die entschieden höher liegenden Werte des Nüchternspeichels.

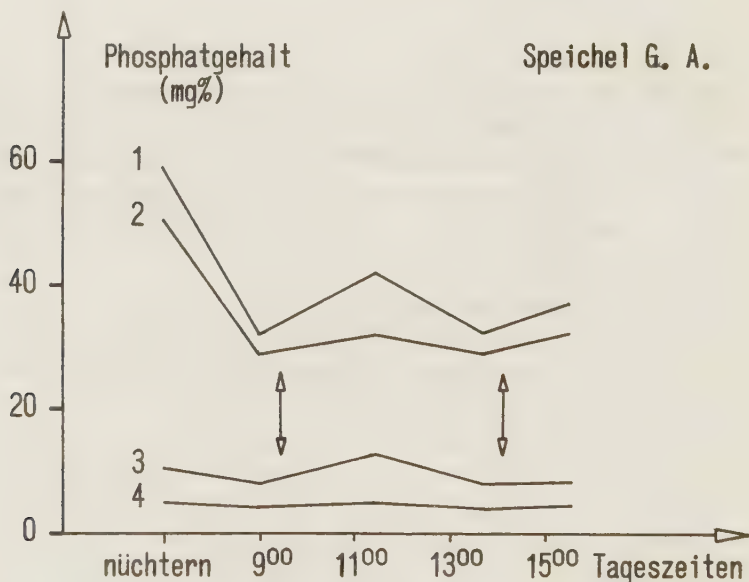


Abb. 5 Tageszeitliche Schwankungen des Speichelphosphatgehaltes (AHRENS, 1969). Die schwarzen Pfeile markieren eingenommene Mahlzeiten.

- 1 = Gesamtphosphat
- 2 = anorganisches Phosphat
- 3 = säureunlösliches organisches Phosphat
- 4 = säurelösliches organisches Phosphat

Durch die Entwicklung der Luminometrie wurde es ermöglicht, die Speichelposphatuntersuchungen, speziell über das ATP, fortsetzen zu können. Die Entdeckung von FORRESTER (1972), daß ATP in gefäßwirksamen Konzentrationen im Blutplasma vorkommt, veranlaßte HASSAN (1974), auch im abzentrifugierten Überstand des gemischten Speichels und im Sekret der Parotis und der Glandula submandibularis nach dieser Verbindung zu suchen. Zusammenhänge zwischen den Blutplasmawerten und denen im Speichel sind durchaus denkbar, weil der Speichel „praktisch ein Ultrafiltrat des Blutplasmas darstellt“ (HORNSTEIN, 1974). Er beobachtete, daß Speichel auf ein Froschherz eine dem ATP ähnliche inotrope Wirkung ausübt, die bei Zugabe von ATP-Diphosphatase zum Speichel verschwindet. Die quantitative Messung mit Hilfe des Biolumineszenzsystems von Glühwürmchen (Luminometrie) ergab:

- 918 ($\pm$ 180) pmol ATP/ml im gemischten Speichel,
- 694 ($\pm$ 97) pmol ATP/ml im Parotisspeichel,
- 85 ($\pm$ 10) pmol ATP/ml im Submandibularisspeichel.

Außerdem verzeichnete er nach Stimulation des Speichelflusses mit 10%-iger Zitronensäure im Parotissekret eine schnellere Abnahme des ATP-Gehaltes, als im Sekret der Glandula submandibularis.

IV. MATERIAL UND METHODE

A. Speichel

Unter "Speichel" versteht man zum einen das Sekret der einzelnen "Speicheldrüsen, zum anderen die Flüssigkeit der Mundhöhle. Während der DrüsenSpeichel weitgehend unbeeinflusst bleibt, spielen in der Zusammensetzung des gemischten Speichels endogene Faktoren, wie Bakterien aus der Mundflora, oder exogene, wie Nahrungsaufnahme oder Zähneputzen, eine große Rolle.

Um den Einfluß, vor allem der Mundflora, auf den ATP-Gehalt des gemischten Speichels richtig einschätzen zu können, war es unbedingt nötig, auch die verschiedenen Drüsensekrete zu untersuchen. Zur Ausschaltung grober exogener Einflüsse wurde stets darauf geachtet, daß der Speichel nicht durch Essensreste verunreinigt war. Auf jede Stimulation der Drüsensekretion mußte verzichtet werden, da eine Arbeit von DAWES (1974) beweist, daß sich die Zusammensetzung der Speicheldrüsensekrete durch Stimulation zum Teil entscheidend verändern. HASSAN (1974) konnte dies sogar speziell für die Menge der Adenosintriphosphorsäure nachweisen (siehe oben).

B. Speichelprobenentnahme

1. Gemischter Speichel

Um zunächst eine allgemeine Bestandsaufnahme der ATP-Menge im gemischten Tagesspeichel machen zu können, wurden Proben von einem größeren Personenkreis gesammelt. Nüchternspeichel fand bei der Untersuchung über die tageszeitlichen Schwankungen Verwendung. Die Versuchspersonen wurden dazu angewiesen, den Speichel möglichst bald nach dem morgendlichen Erwachen abzugeben, um so einen Einfluß durch Frühstück oder

Zähneputzen zu vermeiden.

Die Proben wurden in einem Reagenzglas mit aufgesetztem Trichter gesammelt. Für den Meßvorgang wäre zwar nur eine sehr kleine Menge nötig gewesen, jedoch war wegen der besseren Homogenisierungsmöglichkeit und zur Ausschaltung von Zufälligkeiten, die evtl. durch zu geringe Mengen bedingt worden wären, zumindest 1 ml wünschenswert. In einzelnen Fällen ließ es sich aber nicht vermeiden, daß einer Messung weniger zugrunde lag. Sämtliche Proben wurden möglichst schnell untersucht. Die persönliche Belastung war in allen Fällen gering.

2. Parotisspeichel

In anderen Arbeiten stellte man stets besondere Apparate her, um das Parotissekret direkt am Ausgang des Ductus parotideus auffangen zu können (siehe EGGERS LURA, 1956; KRÖNCKE, 1959; AHRENS und BENEDICT, 1968; AHRENS, 1969; HASSAN, 1974; DAWES, 1974). Hier wurde der Ausführungsgang zunächst mit einer sterilen Knopfsonde zugänglich gemacht, dann ein steriler, elastischer Katheter eingeführt und der Speichel in einem mit Heftpflaster an das Katheterende geklebten Reagenzglas aufgefangen. Er stellte sich meist nach einigen Sekunden ein. Falls dies nicht geschah, half kurzes Aspirieren mit einer sterilen Einmalspritze weiter. Es kam auch vor, daß sich die Wandung des Ausführungsganges vor die Katheteröffnung legte, was sich durch vorsichtiges Zurückziehen des Katheters beheben ließ.

Stets mußte genau darauf geachtet werden, daß alle Teile, die mit dem Speichel in Berührung kamen, steril blieben. Bei der empfindlichen Messung hätten selbst kleinste Verunreinigungen, wie z.B. Berühren des Katheterendes mit den Fingern und damit verbundene Bakterienübertragung, das Ergebnis verfälscht.

Die Prozedur der Kathetereinführung war für die Versuchspersonen mit Unannehmlichkeiten verbunden, was den Umfang dieser

Untersuchungen stark einschränkte. Die gesammelten Proben wurden über einen längeren Zeitraum in kurzen Abständen gemessen.

3. Submandibularisspeichel

Die Einführung eines Katheters in den Ausführungsgang der Glandula submandibularis erwies sich als zu schwierig. Deshalb wurde ein Kunststoffapparat mit Katheter angefertigt, der sowohl die Plica sublingualis als auch die Carunculae sublinguales überkappte. Es handelt sich dabei um eine Modifikation der von SCHNEYER (1955) angewendeten Kunststoffvorrichtung (Abb. 6).

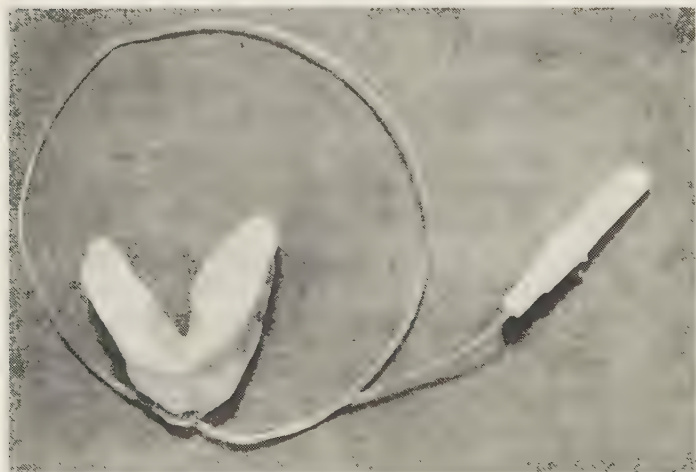


Abb. 6 Kunststoffapparat zur Gewinnung des Submandibularisspeichels. Herstellungsbeschreibungen findet man sowohl bei SCHNEYER (1955) als auch bei KRÖNCKE (1959).

Auf die getrennten Auffangkammern für den Speichel der Gland-

dula sublingualis wurde verzichtet. Nach Angaben von KRÖNCKE (1959) beträgt die Menge des Sublingualisspeichels nur 1/10 - 1/50 des Submandibularisspeichels. Eine Unterscheidung war deshalb für diese Untersuchung unnötig.

Vor dem Einsetzen wurde der Apparat durch längeres Belassen im hochprozentigen Äthanolbad desinfiziert und der Mundboden mit 3-prozentigem H_2O_2 ausgewaschen.

Der Speichel konnte nach Aspiration wiederum in einem an das Katheterende geklebten Reagenzglas aufgefangen und über längere Zeit in kurzen Abständen gemessen werden.

C. Vorbereitung und Messung

1. Gemischter Speichel

Die Probe im Reagenzglas wurde zunächst 30 s lang mittels Ultraschall (100 Watt) homogenisiert. Die anschließend sofort abpipettierten 200 μ l wurden mit 800 μ l 0,9-prozentiger NaCl-Lösung verdünnt (d.h. Verdünnung 1:5). Die zuerst aufgezogene Menge mußte allerdings bei allen Pipettierungen zugunsten einer besseren Volumengenauigkeit verworfen werden. Der Ansatz blieb dann 5 min stehen.

Nach dieser Zeit wurden nach einer nochmaligen 20 s dauernden Homogenisierung mit Ultraschall (100 Watt), gleich zweimal 50 μ l in je eine Rundküvette pipettiert. Zu beiden Ansätzen kamen noch je 50 μ l NRB, bzw. zum zweiten außerdem noch 20 μ l ATP-Standard (1:1000, d.h. 20 ng ATP) hinzu.

Die ATP-Messung erfolgte 60 s später im Lumac-Celltester, nachdem die Proben durch Schütteln gut durchmischt worden waren. Sie wurden in der Reihenfolge „Probe ohne Standard, Probe mit Standard“ gemessen. Verwendet wurde Lumit HS, in 5 ml Hepes-Puffer gelöst. Am Gerät waren das Integral von 10 s und mittlere Empfindlichkeit eingestellt.

2. Steriles Filtrat

Die einzelnen Arbeitsschritte folgten im wesentlichen denen, die zur Messung des gemischten Speichels gemacht wurden.

Die Unterschiede bestanden darin, daß nach der ersten Homogenisierung statt 200 μ l die doppelte Menge, also 400 μ l, abpipettiert und dementsprechend mit 1,6 ml 0,9-prozentiger NaCl-Lösung 1:5 verdünnt wurde, weil eine größere Menge leichter filtriert werden konnte. Außerdem erfolgte nach der zweiten Homogenisierung die Herstellung des sterilen Filtrats.

Zum zweiten Ansatz wurden nur 10 μ l ATP-Standard (1:1000, d.h. 10 ng ATP) zugegeben.

3. Parotisspeichel

Das an das Katheterende geklebte Reagenzglas wurde je nach Sekretion (100 μ l waren für einen Meßvorgang nötig) alle 5 oder 10 min ausgewechselt.

Parotisspeichel brauchte vor seiner Messung weder verdünnt, noch homogenisiert zu werden.

Von dem gewonnenen Speichel konnten also sofort zweimal 50 μ l in je eine Rundküvette pipettiert werden. Die Rundküvetten wurden kurz vorher aus dem Kühlschrank geholt. Zu beiden Ansätzen erfolgte wiederum die Zugabe von je 50 μ l NRB, zum zweiten jedoch 10 μ l ATP-Standard 1:4000, d.h. 2,5 ng.

Die folgenden Arbeitsgänge deckten sich wieder mit den am Anfang genannten. Allerdings wurde am Gerät hohe Empfindlichkeit eingestellt.

4. Submandibularisspeichel

Das Reagenzglas am Katheterende wurde auch hier je nach Sekretion alle 5 oder 10 min ausgetauscht und der ATP-Ge-

halt der aufgefundenen Flüssigkeit im Anschluß daran so bald wie möglich gemessen.

Der Speichel mußte vor dem Abpipettieren 10 s lang mit Ultraschall (100 Watt) homogenisiert werden.

Der restliche Versuchsablauf war bis auf eine Ausnahme mit dem der Parotisspeichelmessung identisch. Zur Steigerung der Empfindlichkeit bei der Meßmethodik wurde Lumit HS verwendet, das in nur 3 ml Hepes-Puffer gelöst war.

5. Verwendete Reagenzien

Für den Versuchsablauf wurden vier verschiedene Reagenzien benötigt, von denen zwei gebrauchsfertig bezogen und zwei selbst hergestellt wurden:

NRB Abimed Analysen-Technik GmbH Best.-Nr. 4015
NRB ist die Abkürzung für „Nucleotide Releasing Reagent for Bacterial Cells“. Die genaue Zusammensetzung wird von der Firma nicht mitgeteilt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein anorganisches Puffersystem. NRB setzt Nucleotide und andere kleine Moleküle aus allen Zellen frei. Bakterien werden nicht aufgelöst, so daß das ATP nicht von zelleigenen Enzymen abgebaut werden kann. Es bedarf allerdings einer kurzen Zeit, bis das ATP ausgetreten ist. Darum wurde auch eine Wartezeit von 1 min zwischen NRB-Zugabe und Messung eingehalten.

Lumit HS Abimed Analysen-Technik GmbH Best.-Nr. 4101
Es handelt sich dabei um ein gereinigtes Luciferin-Luciferase-Reagenz mit hoher Spezifität für ATP. Die Funktion wird im nächsten Kapitel genauer erläutert.

Hepes-Puffer Er wurde nach Angaben der „Lumac Systems AG“ selbst hergestellt und enthält:

0,025 m Hepes = 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-
piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure
(Mol.-Gew. 238)
Merck Art. 10110

0,010 m MgSO_4 (Mol.-Gew. 120)
Merck Art. 5885

In einem Ansatz von 100 ml wurden demnach 595 mg Hepes und 120 mg MgSO_4 gelöst. Der pH-Wert von 7,75 wurde mit 0,1 n NaOH eingestellt und mit dem pH-Meter überprüft.

ATP-Standard Zur Herstellung wurde das Dinatriumsalz von ATP verwendet (Mol.-Gew. 605,2).
Serva 10920

Um die Verdünnung 1:1000 zu bekommen, mußten zwei Ansätze gemacht werden:

1. Ansatz: 10 mg ATP in 10 ml Hepes-Puffer
2. Ansatz: 20 μl vom 1. Ansatz in 20 ml Puffer

Die Verdünnung wurde in einer ATP-Standard Eichkurve überprüft.

Wegen der Instabilität von gelöstem ATP bei Zimmertemperatur mußten kleine Proben zu je 1 ml über längere Zeit bei -20°C eingefroren aufbewahrt werden. Erst unmittelbar vor einer Meßreihe wurde eine Probe aufgetaut und auch dann ständig im Eisbad gehalten.

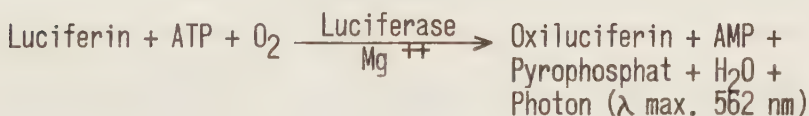
Zur Herstellung der Verdünnung 1:4000 mußten zu einer solchen Probe nochmals 3 ml Puffer hinzugegeben werden.

6. Verwendete Geräte

zur Homogenisierung:	Labsonic 1510, Firma B. Braun
zur sterilen Filtration:	Membranfilter, Millipore Corp.
zur ATP-Messung:	Lumac-Celltester Modell 1030, Abimed Analysen-Technik GmbH

D. Grundlagen der Biolumineszenzmessung

Unter Biolumineszenz versteht man Reaktionen in lebenden Zellen, die Licht emittieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das System der Glühwürmchen zur ATP-Messung genutzt. Die zentrale Rolle spielen das Substrat Luciferin und das Enzym Luciferase. Die folgende Reaktionsgleichung veranschaulicht, wie bei günstigen Bedingungen pro ATP-Molekül ein Photon frei wird:



In Wirklichkeit läuft diese Reaktion komplizierter ab. Die verschiedenen vom Hersteller angegebenen Gleichungen sind jedoch von der Stöchiometrie her unrichtig, oder stimmen nicht überein, so daß diese Gesamtgleichung den Sachverhalt wohl am genauesten widerspiegelt.

Die Umsetzung des ausgesandten Lichtes in die Digitalanzeige der „relativen Lichtintensität“ zeigt das grobe Schema der untenstehenden Abbildung (Abb. 7). Es stammt aus einem Informationsblatt über die Luminometrie, das von der Firma Abimed ausgegeben wurde.

Nach Angaben des Herstellers ist es mit dem für diese Arbeit verwendeten Lumac-Celltester möglich, ATP-Mengen bis zu 50

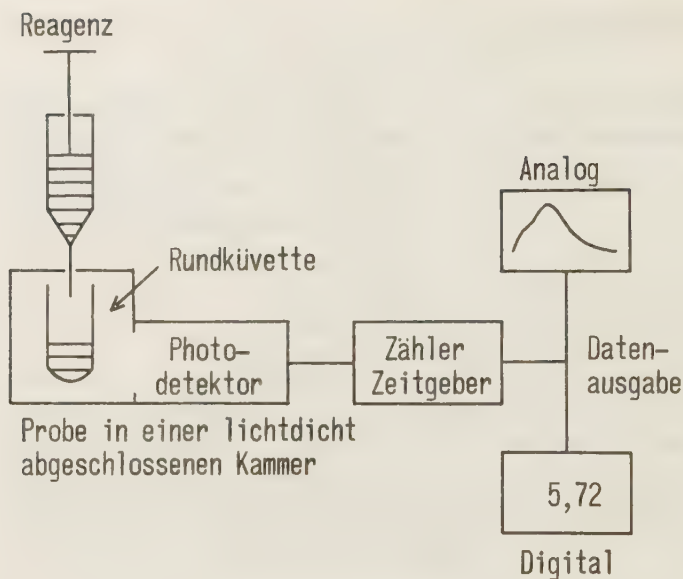


Abb. 7 Prinzip der Lumineszenzmessung

pg hinab zu messen. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 507,19 (RAUEN, 1956) etwa 0,1 pmol. Im übrigen sei an dieser Stelle bei allen Fragen, z.B. über Einzelheiten des Meßablaufs oder Einstellung des Gerätes, auf die Gebrauchsanweisung verwiesen.

Nur der Begriff „Integral“ sei hier noch näher erläutert. Durch die im Gerät eingebaute Elektronik wird es ermöglicht, die Fläche unter der Zeit-Lichtintensitätskurve des Reaktionsablaufes zu berechnen, also die Kurve zu integrieren. Der ATP-Gehalt der Proben kann so mit größerer Genauigkeit gemessen werden. In der obenstehenden Abbildung wird diese Kurve im Analog dargestellt. Um den Meßvorgang abzukürzen, wurde in dieser Arbeit stets das Integral von 10 s gewählt.

Das Lumit HS wurde vom Gerät automatisch zur Probe hinzugegeben. Das Probenvolumen betrug so zum Zeitpunkt der Mes-

sung 200 μ l (50 μ l Speichelprobe + 50 μ l NRB + 100 μ l Lumit HS). Bei der Zugabe des ATP-Standards war es um den entsprechenden Betrag größer.

E. Berechnung der Meßergebnisse

Der gemischte Speichel enthält viele Substanzen, die zu seiner Trübung führen. Dies kann z.B. von Bakterienklumpen oder Mucinschlieren verursacht werden. Zum Teil ist der Speichel auch verfärbt, was besonders bei Rauchern gefunden werden kann. Außerdem weist er hohe Ionenkonzentrationen auf, was natürlich auch für die einzelnen Drüsensekrete gilt, und enthält unter Umständen sogar gewisse Enzymhemmstoffe. Für die Messung bestand also die Gefahr, daß die Photonenabsorption durch Trübung und Färbung, die Hemmung des Luciferin-Luciferase-Systems durch Ionen oder Inhibitoren, oder auch evtl. im Speichel vorkommende ATP spaltende Enzyme, zu einem niedrigeren als dem tatsächlichen Wert führen würden.

Um dies vermeiden zu können, wurde das vom Hersteller angegebene Prinzip der „internen Standardisierung“ angewendet. Dabei wird zunächst eine normale Probe gemessen. Einer zweiten, die in Inhalt und selbstverständlich auch im Volumen der ersten entspricht, wird vor ihrer Messung eine bestimmte Menge ATP, der ATP-Standard, zugesetzt. Nachdem die ausgestrahlte Lichtintensität proportional zum ATP-Gehalt der Probe ist und bei beiden Proben in ähnlicher Weise beeinträchtigt wird, kann aufgrund der Differenz der Ergebnisse auf den Probeninhalt geschlossen werden.

Durch die Zugabe des ATP-Standards ergibt sich allerdings eine Verdünnung, die bei verschiedenen Messungen für diese Arbeit bis zu 10 % betrug. Dieser Wert mußte wegen der höheren Volumengenauigkeit des Standards, die sich durch das Pipettieren von etwas größeren Mengen erzielen läßt, in Kauf genommen werden.

Der ATP-Gehalt der Proben wurde mit Hilfe der nachstehend

aufgeführten Gleichungen berechnet. Zur Erklärung sei dazu noch gesagt, daß die Abkürzung RLU („relative light units“) ein Maß für die „relative Lichtintensität“ darstellt und direkt von der Digitalanzeige des Lumac-Celltesters abgelesen werden kann.

$$1) \frac{\text{ATP-Menge}}{\text{RLU}} = \frac{\text{ATP-Gehalt des Standards}}{\text{Differenz der beiden Meßergebnisse}} = k$$

$$2) k \times \text{RLU der ersten Probe} = \text{ATP-Gehalt der Speichelprobe}$$

Da die Probe vorher 1:5 verdünnt worden war, mußte der Wert dann noch mit 5 multipliziert werden. Weil der Bezug der Ergebnisse auf das Probenvolumen von 50 µl nicht anschaulich war, erfolgte außerdem noch eine Aufmultiplizierung zum Volumen von 1 ml.

Die ursprünglich verwendeten Massenkonzentrationen für ATP (siehe ATP-Standard) wurden nun über das von SERVA, Feinbiochemica Heidelberg, angegebene Molekulargewicht für das Dinatriumsalz von 605,2 in die Stoffmengenkonzentration umgerechnet.

Die empirische Standardabweichung von den Mittelwerten der Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen wurde wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s = Standardabweichung vom Mittelwert

x_i = Einzelergebnis

$\bar{x}$ = Mittelwert der Ergebnisse

n = Anzahl der durchgeführten Messungen

F. Vorversuche

Die Vorversuche dienten zur Entwicklung der günstigsten Meßmethode und zur Lösung auftretender Probleme.

1. Homogenisierung

Das größte Problem zu Beginn dieser Arbeit bestand darin, ein geeignetes Homogenisierungsverfahren zu finden. Ohne Vorbehandlung konnten Speichelproben nicht reproduzierbar gemessen werden, da die Werte zu starken Schwankungen unterlagen. Außerdem gab es beim Pipettieren Schwierigkeiten, weil der Speichel zu viskös war und infolgedessen keine exakten Volumina aufgezogen werden konnten. Ein Ausstrichpräparat mit Gramfärbung ließ genauere Aussagen zu. Große Bakterienklumpen und Mucinschlieren waren die Ursache. Bei der verwendeten empfindlichen Methode mußte es sich natürlich sofort am Ergebnis bemerkbar machen, ob in einer Probe einige Klumpen mehr waren als in einer Vergleichsprobe.

Die Hauptaufgaben der Homogenisierung mußten so darin bestehen, den Speichel pipettierbar bzw. für das sterile Filtrat filtrierbar zu machen und selbstverständlich die Inhaltsbestandteile gleichmäßig zu verteilen. Lediglich beim Parotispeichel konnte eine Ausnahme gemacht werden, weil er dünnflüssig war und nach Angaben von KRÖNCKE (1959) kaum Bakterien darin zu vermuten waren. Weitgehende Keimfreiheit gilt zwar auch für Submandibularisspeichel, er mußte aber wegen seiner großen Viskosität homogenisiert werden.

Der Glashomogenisator Potter-S (Firma B. Braun) erwies sich für die Speichelhomogenisierung als unbrauchbar. Darum wurde mit Ultraschall gearbeitet. Weil gemischter Speichel verdünnt werden mußte (siehe nächstes Kapitel), bot sich eine Kombination von zwei Homogenisierungsschritten an. Die Homogenisierungszeiten wurden entsprechend der erforderlichen Leistung gewählt: d.h. unverdünnter Speichel ohne Vorbehand-

lung wurde 30 s und anschließend verdünnter 20 s homogenisiert. Diese Methode stellte sich auch als die günstigste heraus.

Bereits kurz nach diesen Arbeitsgängen zeigten sich jedoch Entmischungen. Nach einigen Minuten ließen sich deutlich Sediment und Flüssigkeit voneinander unterscheiden. Daher mußte nach jedem Homogenisierungsvorgang sofort die entsprechende Probe abpipettiert werden.

Ein Einfluß der Homogenisierung auf den ATP-Gehalt konnte nicht festgestellt werden, weil Speichel aus den obengenannten Gründen nicht direkt meßbar war. Nachdem aber bekannt ist, daß Bakterien durch Ultraschallbehandlung unter Streß gesetzt werden können und dadurch vermehrt ATP abbauen, sich aber nach kurzer Zeit wieder erholen (nach einem Informationsblatt der Firma Abimed), wurde zwischen beiden Homogenisierungsschritten 5 min gewartet. Dies war zum Teil natürlich auch technisch bedingt und diente so der Standardisierung. Nach der zweiten Homogenisierung wurde keine Pause mehr eingelegt, weil nur noch ein Absinken der ATP-Werte beobachtet werden konnte. Der Hersteller weist außerdem darauf hin, daß die Proben spätestens 5 min nach der Zugabe von NRB gemessen sein sollten.

2. Verdünnung

Gemischter Speichel hatte so hohe ATP-Werte, daß er erst einmal verdünnt werden mußte, um ihn in einen für die Messung günstigen Bereich zu bringen. Dies war bei einer Verdünnung von 1:5 der Fall. 0,9-prozentiger Kochsalzlösung wurde als Verdünnungsflüssigkeit gegenüber destilliertem Wasser der Vorzug gegeben, um eine Zerstörung der Bakterien durch ein zu hohes osmotisches Druckgefälle zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu vermeiden. Die nachstehende Abbildung (Abb. 8) zeigt die gerundeten Mittelwerte, die bei verschiedenen Verdünnungen gemessen wurden.

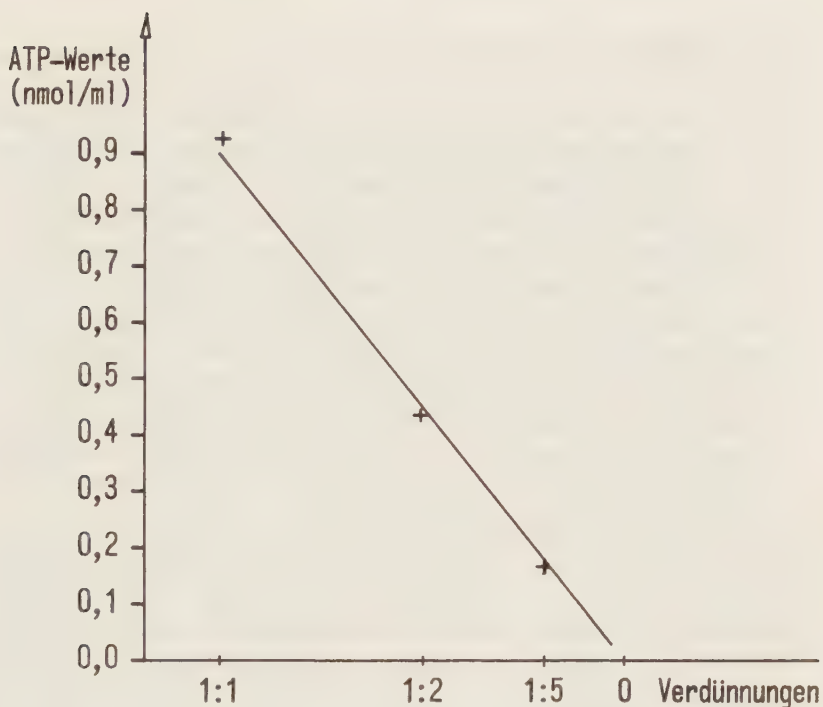


Abb. 8 Gemessene Mittelwerte verschiedener Verdünnungen

Bei mehreren Messungen dieser Art, für die auch Verdünnungen im Bereich zwischen 1:1 und 1:2 hergestellt wurden, konnte man stets ein leichtes Absinken der Werte beobachten, sobald Speichel mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung in Berührung kam. Als Ursachen dafür kommen möglicherweise eine durch Na^+ -Ionen gesteigerte ATP-ase Aktivität (siehe auch SCHNEYER, 1964) oder ein osmotischer Schock in Frage, weil 0,9-prozentige Kochsalzlösung zwar isoton zur Blutflüssigkeit, Speichel aber gegenüber dem Blut stets hypoton ist (KEIDEL, 1975; HORNSTEIN, 1974). Dies könnte bei den Bakterien im Speichel unter Umständen zu einem erhöhten Verbrauch von ATP durch die Na^+ - K^+ -Pumpe geführt haben.

3. Lagerung des Speichels

Es war für die Untersuchung von großer Bedeutung, genau über die Änderungen des ATP-Gehalts im Zeitraum von der Entnahme bis zur Messung Bescheid zu wissen. Zu diesem Zweck wurde eine größere Speichelmenge entnommen und homogenisiert. Danach wurden mehrere Ansätze hergestellt und verschiedenen Bedingungen unterworfen. Die Messungen erstreckten sich über eine Zeit von 1 h, da für die Hauptuntersuchungen keine größeren Zwischenzeiten zu erwarten waren. Es stellte sich heraus, daß der ATP-Gehalt in allen Ansätzen stetig absank. Die Kühlung mit Eis brachte gegenüber dem Stehenlassen bei Raumtemperatur geringfügig höhere Werte. Am besten war das Ergebnis bei der Probe, die sofort eingefroren und nach 1 h wieder aufgetaut wurde.

WEBER (1930) befaßte sich mit der Verdünnung der organischen Phosphatfraktionen im Speichel und fand, daß in den ersten Stunden nach Stehenlassen bei Raumtemperatur die Menge des anorganischen Phosphats durch Spaltung der organischen Phosphatverbindungen zunahm. Dieses Ergebnis konnte von AHRENS (1969) bestätigt werden. Er untersuchte außerdem den Einfluß der niedrigen Temperatur im Kühlschrank und des Einfrierens bei -28°C auf den Zerfall der organischen Phosphatfraktion und kam zu dem Schluß, daß "diese Maßnahmen zwar eine Verlangsamung, keineswegs aber eine vollständige Hemmung dieses Vorganges" herbeiführten.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es deshalb ratsam, die entnommenen Proben möglichst bald zu messen.

4. Kühlung der Rundküvetten

Bei Messungen im hohen Empfindlichkeitsbereich des Lumac-Celltesters, zur Bestimmung des ATP-Gehalts der reinen Drüsensekrete, zeigte es sich, daß die Rundküvetten, die in die Zählkammer des Gerätes gebracht wurden, eine Eigenstrah-

lung besaßen. Sie konnte deutlich gemessen werden, egal ob die Küvetten mit Lumit gefüllt oder leer waren. Die Vermutung, daß dies von Verunreinigungen herrühren könnte, erwies sich als falsch, weil sogar mehrmaliges Ausspülen mit destilliertem Wasser und Aceton keine Besserung brachte. Selbstverständlich wurde auch vermieden, die Küvetten mit den Fingern anzufassen. Um eine mögliche Aufladung durch Tageslicht zu verhindern, wurden sie über längere Zeit im Dunkeln gehalten. Dies brachte einen kleinen Erfolg. Aber erst die Abkühlung im Kühlschrank auf $+4^{\circ}\text{C}$ und die damit verbundene Dunkelhaltung konnte diesen Effekt auf ein Minimum beschränken. Für alle Versuche wurden deshalb gekühlte Rundküvetten verwendet. Der Fehler betrug dann maximal nur noch 5 %.

Die genaue Ursache für das Auftreten der Eigenstrahlung konnte jedoch nicht ermittelt werden.

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der ersten Versuchsreihe wurde für eine allgemeine ATP-Bestandsaufnahme bei 40 Personen je eine Speichelprobe entnommen und gemessen. Der Personenkreis setzte sich aus Studenten und Klinikpersonal im Alter von 18 – 47 Jahren zusammen. Niemand trug einen größeren Zahnersatz. Die einzelnen Messungen erfolgten über den ganzen Tag verstreut, wobei 19 vormittags und 21 nachmittags stattfanden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9 zusammengestellt.

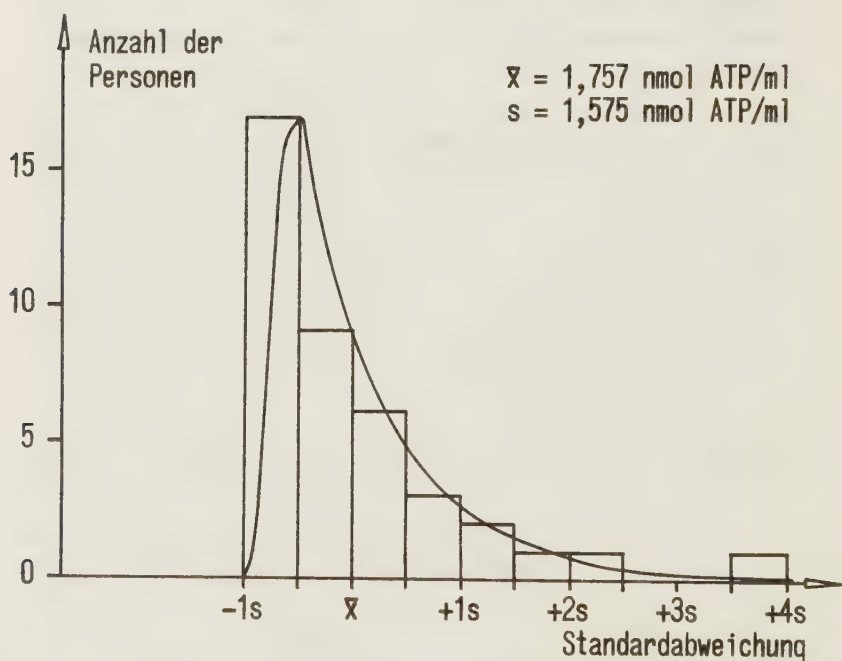


Abb. 9 Häufigkeitsverteilung der 40 gemessenen Werte

Die Werte ergeben keine Gauß' Verteilung, der Gipfel ist viel-

mehr nach links verschoben. Der Mittelwert von 1,757 nmol/ml ist höher als der von HASSAN (1974, siehe Literaturübersicht) für den abzentrifugierten Überstand des gemischten Speichels. Andererseits ist er entschieden niedriger als die Angaben von AHRENS und RANKE (1961, siehe Literaturübersicht) und die meisten von NAUJOKS, BRAMSTEDT, KRÖNCKE und MARG (1958, siehe Literaturübersicht) ermittelten ATP-Mengen im Nüchternspeichel, die bei kariesanfälligen Personen zwischen 0 - 217 mg/ml lagen. Der hier gefundene Mittelwert würde dagegen umgerechnet nur etwa 1,06 µg/ml betragen. Die Feststellung dieser Autoren, daß „der Gehalt des Speichels an ATP ... erheblichen Schwankungen unterliegt“, trifft auch für die in diesem Versuch gemessenen Werte voll zu. Das zeigt sich besonders an der hohen Standardabweichung, die beinahe der Größe des Mittelwertes entspricht. Die starke Streuung über ein Vielfaches der Standardabweichung weist außerdem darauf hin.

Bei der näheren Analyse der Ergebnisse ließ sich keine Abhängigkeit des ATP-Gehalts von Alter, Geschlecht oder entnommener Speichelmenge feststellen. Aber es bestand ein Zusammenhang mit der Anzahl und Größe flockiger Bestandteile im Speichel, wahrscheinlich Bakterien- und Mucinkonglomerate. Je zahlreicher und größer sie waren, desto höher lagen die ATP-Werte.

Insgesamt konnte im Durchschnitt vormittags mehr ATP gemessen werden, als nachmittags. Allerdings hätte dies auch rein zufällig sein können. Deshalb wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt, die diese tageszeitlichen Schwankungen genauer wiedergeben sollte. Sie umfaßte zwei Meßreihen mit je drei Versuchspersonen. Die Proben wurden zu bestimmten Tageszeiten gesammelt, in der Regel vor oder nach Mahlzeiten. Die graphische Darstellung (Abb. 10) zeigt in wesentlichen Zügen den gleichen Verlauf, wie das Forschungsergebnis von AHRENS (1969, siehe Literaturübersicht). Seine Beobachtung, daß „das Ausmaß der Schwankungen individuell

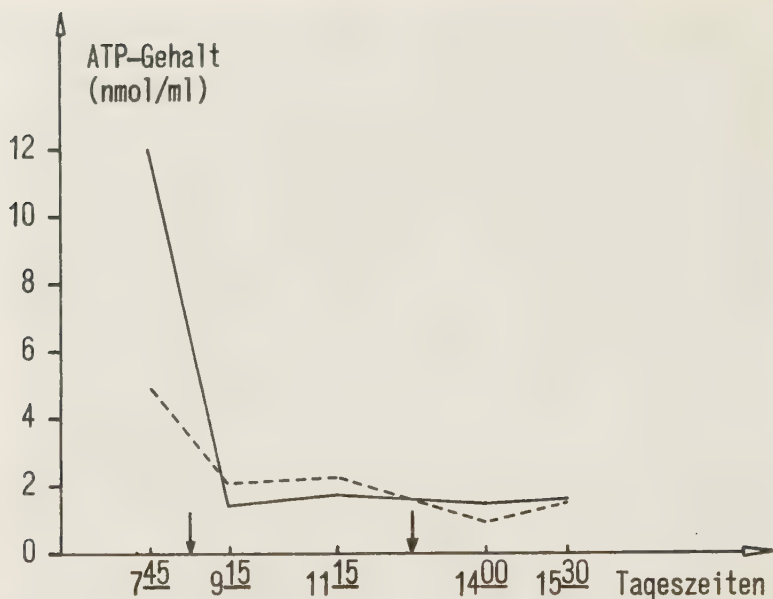


Abb. 10 Mittelwerte zweier Meßreihen über die tageszeitlichen Schwankungen des ATP-Gehalts im Speichel. Die Mahlzeiten sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

verschieden zu sein scheint", gilt auch hier. Bei einzelnen Personen konnte es vorkommen, daß ihre Werte z.B. bis zum frühen Nachmittag stets niedriger wurden, also vor dem Mittagessen keinen Anstieg aufwiesen, oder am späteren Nachmittag absanken, anstatt, wie in der Abbildung zu sehen, wieder langsam anzusteigen. In allen Fällen konnte jedoch, ähnlich wie bei AHRENS, ein starker Abfall vom Nüchtern- zum Tagesspeichel beobachtet werden. Nüchternspeichel hatte auch bei den Einzelergebnissen das meiste ATP, gekoppelt mit dem höchsten Gehalt an Schwebeteilchen. Die größten individuellen Schwankungen waren ebenfalls bei ihm anzutreffen.

Die tageszeitliche Abhängigkeit bei den zuerst gemessenen 40 Speichelwerten machte eine Gegenüberstellung der Untersuchungen interessant. Die Zuordnung dieser Ergebnisse war allerdings nicht immer einfach. Die Vormittagswerte mußten zusammengefaßt werden, weil sie nicht auf die beiden Meßzeiten der zweiten Untersuchung verteilt werden konnten, und ein Nachmittagswert wurde weggelassen, da er nach Angaben des Untersuchten eher Morgenspeichel entsprach. Die Mittelwerte der zeitlich vergleichbaren Ergebnisse zeigt die nun folgende Tabelle (Tab. 1). Außerdem gibt sie auch die Anzahl der Werte an, auf die sich diese Angaben stützen.

	A	B	Abweichung von B zu A
Durchschnittswerte insgesamt	1,757 n = 40	1,57 n = 24	10,6 %
Vormittagswerte	1,8 n = 19	1,84 n = 12	2,2 %
Nachmittagswerte bis 15 ⁰⁰	1,22 n = 13	1,16 n = 6	4,9 %
Nachmittagswerte ab 15 ⁰⁰	2,31 n = 7	1,45 n = 6	37,2 %

Tab. 1 Gegenüberstellung der zeitlich vergleichbaren Durchschnittswerte aus beiden Untersuchungen. Angaben in nmol/ml.

A = allgemeine Untersuchung

B = Untersuchung über die tageszeitlichen Schwankungen

Wie die niedrigen Prozentangaben veranschaulichen, konnte mit Ausnahme der Nachmittagswerte ab 15⁰⁰ Uhr eine gute Übereinstimmung festgestellt werden. Vielleicht liegt die Ursache für die große Abweichung auch darin, daß für den Vergleich insgesamt die geringste Anzahl an Meßergebnissen zur Verfügung stand.

Bevor man jedoch den Versuch machen kann, die tageszeitlichen Schwankungen zu erklären, muß zunächst einmal die Herkunft des ATP ermittelt werden. Das Ergebnis von HASSAN (1974) zeigte bereits, daß der Wert für den abzentrifugierten Überstand nicht so hoch war wie der für den hier verwendeten Vollspeichel (siehe oben). In einem eigenen Versuch konnte bei zentrifugiertem Speichel mehr ATP im Sediment als im dekantierten Überstand gemessen werden. Nachdem sich im Sediment nur relativ schwere Bestandteile befinden, wie z.B. Bakterien, stellte sich nun die Frage, inwieweit das ATP aus Bakterien zum Ergebnis beitrug. Deshalb wurden einige sterile Filtrate hergestellt, deren ATP-Gehalt in den untenstehenden Tabellen (Tab. 2a und 2b) aufgeführt ist.

Nach den Resultaten dieser Messungen muß das meiste ATP aus den Bakterien stammen. Ein konstantes Verhältnis zwischen Speichel und seinem Filtrat läßt sich nicht ablesen. Vielmehr scheinen diese Werte völlig unabhängig voneinander zu sein. Dies beweist vor allem der Umstand, daß beim Nüchternspeichel, trotz seines höheren Mittelwertes, im Filtrat durchschnittlich beinahe die gleiche Menge an ATP vorhanden war wie im Filtrat des Tagesspeichels.

Anlaß zur Diskussion gibt die Frage, inwieweit Bakterien durch den Homogenisierungsvorgang zerstört wurden. Ihr intrazellulärer ATP-Gehalt wäre dann natürlich in das Meßergebnis für das sterile Filtrat mit eingegangen. Dieser Einfluß ließ sich ebensowenig klären, wie der des Homogenisierens auf den gesamten ATP-Gehalt (siehe oben).

Aus diesem Grunde konnte nur eine Untersuchung der reinen Drüsensekrete Genaueres über die tatsächlich vorhandene

	unfiltrierter Tagesspeichel	steriles Filtrat
M. H.	2,67	0,19
E. R.	1,05	0,11
U. D.	3,07	0,67
D. D.	4,11	0,22
I. L.	0,89	0,16
H. F.	0,69	0,07
	$\bar{x} = 2,08$	$\bar{x} = 0,24$

Tab. 2a Gegenüberstellung von unfiltriertem Tagesspeichel und dem dazugehörigen sterilen Filtrat. Angaben in nmol/ml.

	unfiltrierter Nüchternspeichel	steriles Filtrat
E. R.	10,16	0,23
M. H.	4,64	0,19
I. L.	1,86	0,17
H. F.	29,39	0,29
	$\bar{x} = 11,51$	$\bar{x} = 0,22$

Tab. 2b Gegenüberstellung von unfiltriertem Nüchternspeichel und dem dazugehörigen sterilen Filtrat. Angaben in nmol/ml.

Menge an freiem ATP im Speichel bringen. Vorausgesetzt wird dabei die Erkenntnis von KRÖNCKE (1959), daß reiner Drüsen-speichel weitgehend keimfrei ist. Für die Parotisspeichel-messung standen 4 Versuchspersonen und für die Submandibularisspeicheluntersuchung nur 1 Versuchsperson zur Verfügung. Zum Ausgleich für die geringe Anzahl wurden die Messungen stets über einen längeren Zeitraum durchgeführt, bis ungünstige Umstände, wie z.B. Schmerzen und stockender Speichelfluß, zum Abbruch zwangen. Die Meßreihe mit Submandibularisspeichel wurde sogar wiederholt.

Es zeigte sich, daß die Werte der zuerst gewonnenen Proben immer entschieden höher waren als die darauf folgenden. Die Ursachen hierfür konnten eine Bakterienverschleppung bei der Kathetereinführung bzw. noch vorhandene Bakterien in der Umgebung des Ausführungsganges der Glandula submandibularis sein. Diese Meßergebnisse werden deshalb in den graphischen Darstellungen (Abb. 11 und 12) nicht berücksichtigt.

Die Kurven ergeben auch hier keine Gauß' Verteilung. In allen Fällen sind die Gipfel wiederum nach links verschoben. Die individuellen Unterschiede sind groß, jedoch kommt noch der Aspekt hinzu, daß selbst die Werte einzelner Personen recht hohen Schwankungen unterliegen.

Die Feststellung von EGGERS LURA (1956, siehe Literaturübersicht), „daß sämtliche Speicheldrüsen ATP enthalten und daß der gemischte Speichel immer mehr ATP als der reine Parotisspeichel enthält“, konnte mit dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Allerdings sind die dabei ermittelten ATP-Mengen erheblich geringer als die des gemischten Speichels. Dies erklärt auch das Ergebnis von AHRENS und BENEDICT (1968, siehe Literaturübersicht), die in den Drüsensekreten kein ATP finden konnten, weil ihre Meßmethodik hierfür zu unempfindlich war. Im Zusammenhang mit ihren Resultaten ist weiterhin interessant, daß der ATP-Gehalt im Parotissekret stets höher war als der des Submandibularisspeichels, was

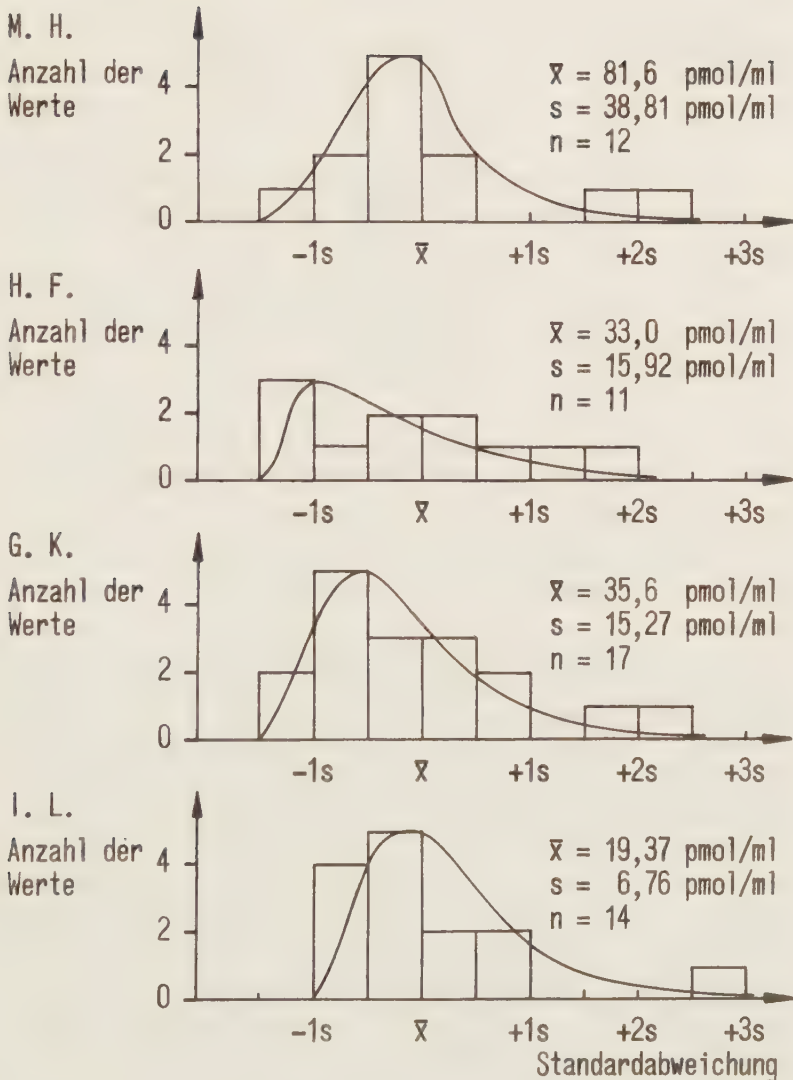


Abb. 11 Ergebnisse der Parotisspeichelmessung in ihrer Häufigkeitsverteilung. Der Mittelwert von allen 4 Meßreihen beträgt $42,4 \text{ pmol/ml}$.

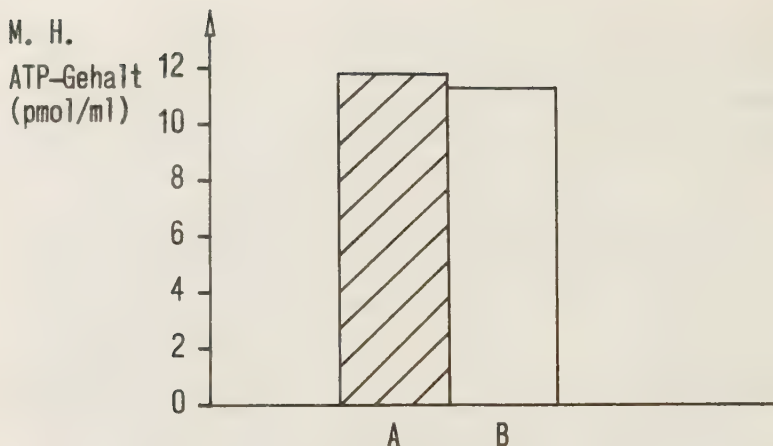


Abb. 12 Durchschnittswerte der Submandibularisspeichelmessung.

A = 1. Meßreihe mit 6 Werten

B = 2. Meßreihe mit 7 Werten

sie beim Gesamthosphatgehalt beobachten konnten und HASSAN (1974, siehe Literaturübersicht) sogar speziell für das ATP. Er erhielt jedoch bei beiden Drüsensekreten höhere Werte. Die Meßvorbereitungen und der Meßablauf wurden in seiner Abhandlung zwar nicht beschrieben, man kann aber annehmen, daß die Messungen nicht über einen längeren Zeitraum erfolgten. Die zuerst aufgefangenen Proben dieser Untersuchung hatten schließlich auch einen höheren ATP-Gehalt. Außerdem verwendete er zur Parotisspeichelgewinnung keinen Katheter, sondern einen Kunststoffapparat (siehe Kapitel „Speichelprobenentnahme“). Diese Methode ist natürlich gegenüber Einflüssen des Mundhöhlenmilieus anfälliger.

Nachdem Fehler infolge Verunreinigungen durch gemischten Speichel weitgehend ausgeschlossen werden können, bleibt die Frage nach der Herkunft des ATP. Geht man davon aus, daß Bakterien durchschnittlich 1 fg ATP besitzen (nach ei-

nem von der Firma Abimed herausgegebenen Informationsblatt über die Luminometrie), müßten in jedem ml einige zehntausend vorhanden sein, um die Meßwerte zu erreichen. KRÖNCKE (1959) konnte lediglich in einem Falle ... etwa 100 Keime je ml Speichel¹¹ finden. Aus Bakterien kann das ATP also nicht stammen. Möglicherweise spielen abgestorbene Drüsenzellen eine Rolle. Allerdings ist es fraglich, ob sich in ihnen überhaupt noch ATP befindet. Wahrscheinlicher scheint dagegen die Herkunft aus dem Blutplasma zu sein, in dem gut meßbare ATP-Werte nachgewiesen werden konnten. Die Angaben von FORRESTER (1972, siehe Literaturübersicht) reichen immerhin von 0,033 bis 1,0 nmol/ml. Vielleicht geben auch die Drüsenzellen selbst ATP ab. Über den eigentlichen Sekretionsmechanismus der Speicheldrüsen ist allerdings noch nichts bekannt.

Obwohl gewisse Anzeichen dafür sprechen (Abb. 13), daß zwischen Sekretionsrate und ATP-Werten ein Zusammenhang besteht, erlaubt die geringe Anzahl von Untersuchungen keine Aussage. Das Sekretionsvolumen konnte mit Hilfe der für den Meßvorgang verwendeten Kolbenhubpipetten einigermaßen genau bestimmt werden.

Die Speichelfließrate ist aber sicher die Ursache für die tageszeitlichen Schwankungen des ATP-Gehalts im gemischten Speichel. DAWES (1974) gab ein Diagramm heraus (Abb. 14; siehe auch SCHNEYER et al., 1956), das den Speichelfluß in Abhängigkeit von der Tageszeit darstellt. Darin wird anschaulich gezeigt, wie die Sekretion bis zum Nachmittag stark ansteigt und nachts im Schlaf auf einen Minimalwert absinkt. Für den ATP-Gehalt verhält sich das umgekehrt. Eine plausible Erklärung hierfür ist der durch hohen Speichelfluß eintretende Verdünnungseffekt. Im Zusammenhang mit anderen Speicheluntersuchungen brachte auch AHRENS (1969) eine Beschreibung dieses Vorgangs.

Wenn man annimmt, daß nachts durch geringe Sekretion ein ungehindertes Zellwachstum stattfinden kann, muß der sofort

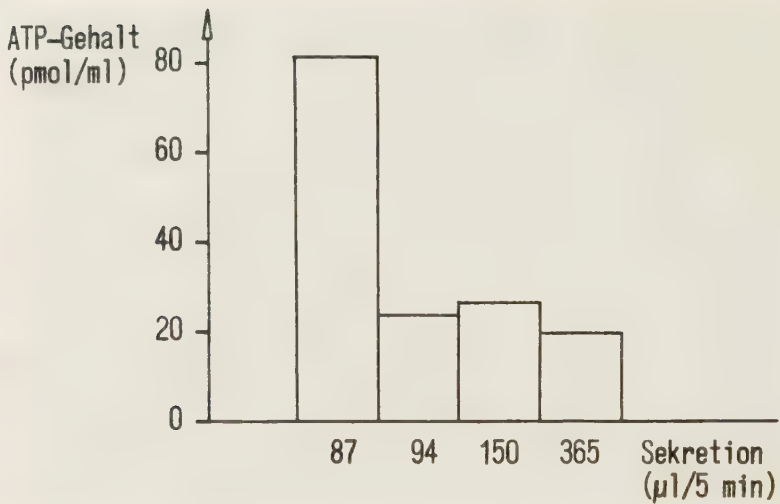


Abb. 13 Mittelwerte der Parotisspeichelmessungen in Abhängigkeit von der Sekretionsrate.

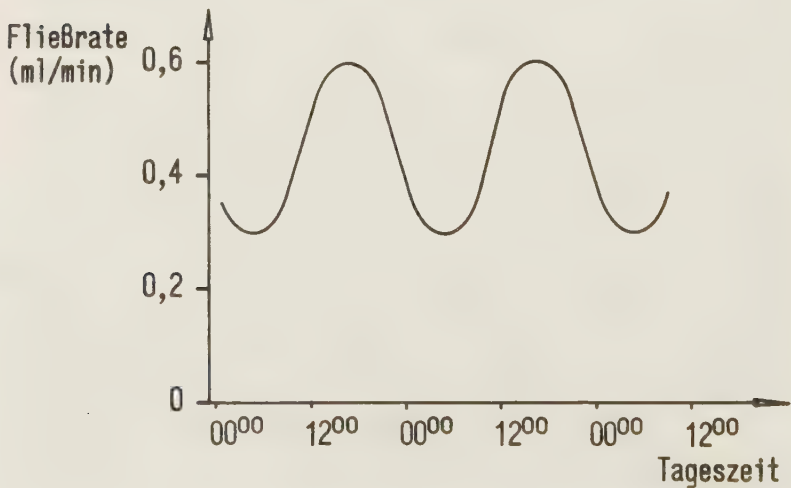


Abb. 14 Tageszeitliche Schwankungen der Speichelfließraten nach DAWES (1974).

nach dem Erwachen entnommene Nüchternspeichel die höchsten ATP-Werte aufweisen. Hat eine Versuchsperson dagegen bereits mehrmals vor der Speichelabgabe geschluckt, sind die größten Bakterienkonzentrationen schon verloren gegangen. Ein Abfall des ATP-Gehalts in den Proben ist die Folge. Wahrscheinlich sind die hohen Schwankungen bei den Nüchternspeichelwerten teilweise darauf zurückzuführen. Bei starker Sekretion ist dagegen eine Annäherung an ein ATP-Minimum zu erwarten, das individuell durch Mundhygiene, Zellwachstum und Bakterien-schlupfwinkel bestimmt wird. Vielleicht führt dieser Umstand auch zur Linksverschiebung des Kurvengipfels in Abbildung 9.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Unter den verschiedenen im Speichel vorkommenden Phosphatverbindungen nimmt die Adenosintriphosphorsäure eine besondere Stellung ein, da sie an vielen Stoffwechselvorgängen der Mundflora, wie z.B. Kohlenhydratabbau und Atmung, beteiligt ist. Deshalb sind Angaben über ATP-Mengen im Speichel für die Kariesforschung von Bedeutung. Vor der Entwicklung der Luminometrie war es jedoch mit anderen Methoden kaum möglich, den ATP-Gehalt im Speichel zu bestimmen. Diese Untersuchung, die sich dieser neuen Meßtechnik bedient, hat nun im einzelnen folgende Ergebnisse:

- Der Mittelwert des Tagesspeichels liegt bei 1,757 nmol ATP/ml, wobei allerdings sehr große, individuelle Schwankungen zu verzeichnen sind.
- Die Tagesuntersuchung zeigt einen hohen Wert für Nüchternspeichel, der dann zu einem Pegel des Tagesspeichels absinkt. Die Schwankungen der Tageswerte erreichen nicht mehr das Ausmaß des Abfalls vom Nüchtern- zum Tagesspeichel.
- Das sterile Filtrat hat einen ATP-Gehalt, der um rund eine Zehnerpotenz unter dem des Tagesspeichels liegt. Dies beweist, was durch die Drüsenspeicheluntersuchungen zudem noch bestätigt wird, daß das meiste ATP bakterieller Herkunft ist.
- Die niedrigsten ATP-Werte sind in den reinen Drüsensekreten anzutreffen. Sie liegen im Durchschnitt für Parotisspeichel bei 42,4 pmol/ml und für Submandibularspeichel bei 11,5 pmol/ml.

VII. LITERATUR

- AHRENS, G. 1961: Beziehungen zwischen dem Phosphatgehalt des Speichels und Karies - Arch. oral Biol. 6, 241
- AHRENS, G. 1969: Zahnkaries und Speichel - Carl Hanser Verlag München
- AHRENS, G. und BENEDICT, I. 1968: Säulenchromatographie säurelöslicher organischer Phosphate des Vollspeichels sowie der reinen Speicheldrüsensekrete des Menschen - Dtsch. zahnärztl. Z. 23, 736
- AHRENS, G. und RANKE, B. 1961: Energiereiche Phosphate im menschlichen Speichel - Dtsch. zahnärztl. Z. 16, 196
- BRAMSTEDT, F. und VONDERLINN, R. 1952: Die Sauerstoffaufnahme des Speichels und ihre Beziehung zur Zahnkaries - Zahnärztl. Welt 7, 505
- BRAMSTEDT, F., KRÖNCKE, A., NAUJOKS, R. und VONDERLINN, R. 1954: Die Verbrennung organischer Substrate im Speichel kariesresistenter und kariesanfälliger Personen - Dtsch. zahnärztl. Z. 9, 782
- DAWES, C. 1974: Rhythms in salivary flow rate and composition - Int. J. Chronobiol. 2, 253
- EGGERS LURA, H. 1947: Investigations on the salivary phosphates and phosphatases - J. Dent. Res. 26, 203
- EGGERS LURA, H. 1949: Untersuchungen über die biologische Remineralisation kariöser Zähne - Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 59, 181
- EGGERS LURA, H. 1956: Papierchromatographische Untersuchungen über den Gehalt an labilem, energiereichem Phosphat im Speichel von kariesresistenten und kariesaktiven Versuchspersonen - Dtsch. zahnärztl. Z. 11, 70
- EGGERS LURA, H. 1961: Diskussion zum Vortrag von G. AHRENS

- über „Energiereiche Phosphate im menschlichen Speichel“ - Dtsch. zahnärztl. Z. 16, 198
- ENTIN, D. A. und GEIKIN, M. K. 1928: Über den Phosphatgehalt im Speichel - Dtsch. Mschr. Zahnheilk. 46, 867
- FORRESTER, T. 1972: An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle - J. Physiol. 224, 611
- HASSAN, M. O. 1974: The identification of adenosine triphosphate in human saliva - J. Physiol. 144
- HORNSTEIN, O. P. 1974: Entzündliche und systemische Erkrankungen der Mundschleimhaut - Thieme Verlag Stuttgart
- KEIDEL, W. D. 1975: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie - Thieme Verlag Stuttgart
- KRÖNCKE, A. 1959: Freie Zucker im menschlichen Nüchternspeichel und deren Beziehung zur Zahnkaries - Barth Verlag Leipzig
- MATHIS, H. 1934: Beiträge zur Chemie des Speichels - Z. Stomat. 32, 1188
- NAUJOKS, R., BRAMSTEDT, F., KRÖNCKE, A. und MARG, H. 1958: Einfluß niedriger Fluorkonzentrationen auf die energiereichen Phosphate des Speichels - J. dent. belge 6, 403
- PICKERILL, H. P. 1913: Verhütung von Zahnkaries und Mundsepsis - Meusser Verlag Berlin
- RAUEN, H. M. 1956: Biochemisches Taschenbuch - Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg
- SCHNEYER, L. H. 1955: Method for the collection of separate submaxillary and sublingual salivas in man - J. Dent. Res. 34, 257
- SCHNEYER, L. H. und SCHNEYER, C. A. 1964: Secretion of

saliva - Adv. oral Biol. 1, 1

SCHNEYER, L. H., PIGMAN, W., HANAHAN, L. B. und GILMORE, R. W. 1956: Rate of flow of human parotid, sublingual, and submaxillary secretion during sleep - J. Dent. Res. 35, 110

WEBER, R. 1930: Über die Phosphorsäure des Speichels - Z. Stomat. 28, 223

YOUNGBURG, G. 1932: The phosphorus of saliva, with special reference to dental caries - J. Dent. Res. 12, 267

ZETKIN/SCHALDACH, H. 1974: Wörterbuch der Medizin - dtv und Thieme Verlag Stuttgart

VIII. ANHANG

Einzelergebnisse der 1. Untersuchung:

Initialen der Versuchspersonen	Alter	Entnahmezeitpunkt	ATP-Menge (nmol/ml)
M. F.	22	14 ⁵⁵	0,323
A. B.	21	10 ⁴⁰	0,350
E. W.	22	14 ⁰⁵	0,397
T. S.	25	9 ⁴⁰	0,428
I. L.	23	14 ¹⁰	0,491
S. K.	41	10 ²⁰	0,598
C. H.	27	14 ⁰⁵	0,642
U. D.	24	14 ²⁵	0,661
T. S.	36	10 ²⁵	0,668
S. M.	19	10 ³⁰	0,684
E. N.	29	15 ⁰⁰	0,731
D. D.	37	14 ³⁰	0,739
H. F.	25	14 ⁴⁰	0,747
E. L.	23	10 ²⁰	0,760
M. H.	23	15 ⁴⁵	0,763
J. B.	18	9 ³⁵	0,866
E. S.	47	9 ²⁰	0,925
E. R.	24	9 ⁵⁰	0,997
I. L.	23	14 ⁴⁰	1,015
W. B.	32	10 ²⁰	1,137
G. G.	44	14 ⁵⁰	1,290
E. Q.	33	14 ¹⁵	1,314
M. M.	26	15 ⁰⁰	1,539
W. H.	26	10 ¹⁵	1,607
M. S.	25	14 ²⁵	1,653
T. B.	22	14 ⁴⁵	1,694
M. B.	24	15 ¹⁰	1,811
H. W.	20	10 ²⁵	1,936
A. F.	30	11 ⁴⁰	1,990

Initialen der Versuchspersonen	Alter	Entnahmezeitpunkt	ATP-Menge (nmol/ml)
G. W.	29	10 ⁰⁰	2,088
K. S.	25	9 ³⁰	2,138
R. D.	21	9 ¹⁵	2,385
C. S.	25	15 ¹⁰	2,846
E. K.	26	9 ³⁵	2,951
T. B.	24	15 ⁰⁰	3,179
F. K.	28	14 ²⁰	4,072
J. H.	19	10 ⁴⁰	4,075
E. T.	20	14 ¹⁰	4,872
H. K.	26	15 ⁰⁵	5,314
W. W.	23	10 ⁰⁰	7,612
			70,288
			<u>$\bar{x} = 1,757$</u>

Auf den beiden nächsten Seiten befindet sich ein Protokoll, wie es für alle 40 Versuche geführt wurde.

Einzelergebnisse der Tagesuntersuchungen:

1. Untersuchung

Initialen	7 ⁴⁵	9 ¹⁵	11 ¹⁵	14 ⁰⁰	15 ³⁰
M. H.	4,64	2,67	2,48	1,81	2,16
I. L.	1,86	0,89	1,24	0,87	0,72
H. F.	29,39	0,67	1,41	1,46	1,59
Nüchternspeichel			Tagesspeichel		

Die Wertetabelle der 2. Untersuchung befindet sich auf Seite 50!

Versuchs - Nr. : 4

Datum : 27.3.79.

Versuchsprotokoll1) Patient

Name : MATTHIAS HEIN

Geburtsdatum : 10.5.55.

Alter : 23

Allgemeinerkrankungen : keine

Gebißzustand :

- Kariesresistenz : - 1
- Zahnersatz : /
- Zahnstein : wenig
- Gingivitis : /
- Parodontitis : /
- Parodontose : /

letzte Nahrungsaufnahme : 12 30

letztes Zähneputzen : 8 00

2) Speichel

Menge : ~ 1 mg

Konsistenz : kleine Flocken

Farbe : weiß - gelblich

HOMOGENISIERUNGSZEIT : 30 sec

abpipettierte Speichelmenge : 200 µl

Verdünnung des Speichels mit : 0,8 ml 0.9% NaCl-L.

Dies entspricht einer Verdünnung von :

1/5

3) Messung der ATP - Menge

Speichelmenge + Verdünnungsflüssigkeit	:	1	g
Homogenisierungszeit	:	20	sec
Art des LUMIT'S	:	HS	
Integral	:	10	sec
Sensitivity	:	100	
Art des ATP - Standards : - Menge	:	20	µl
- Verdünnung	:	1/1000	
- Inhalt	:	20	ng
Probeninhalt : - NRB	:	50	µl
- Speichelverdünnung	:	50	µl

zu (4)

Warten + Schütteln	:	60	sec
RLU (Probe)	:	2,1	
RLU (Probe)	:		
RLU' (Probe mit Standard)	:	11,2	
RLU' (Probe mit Standard)	:		
Differenz	:	9,1	
ATP - Menge / Probe	:	4,61	ng / Probe
ATP - Menge / 50 μ l	:	23,08	ng / 50 μ l

4) Berechnung der ATP - Menge

- Berechnung von k :

$$\frac{\text{ng ATP im Standard}}{\text{RLU}' - \text{RLU}} = \frac{20}{7,6} \frac{\text{ng}}{\text{RLU}} = \frac{2,63}{\text{RLU}} \text{ ng} = k$$

- Berechnung von ATP - Menge / Probenvolumen :

$$k * \frac{\text{RLU}}{\text{Probenvolumen}} = \frac{2,63}{\text{RLU}} \text{ ng} * \frac{6,0}{\text{Probe}} \text{ RLU} =$$

$$= \frac{15,78}{\text{Probe}} \text{ ng}$$

- Berechnung von ATP - Menge / 50 μ l :

$$\frac{\text{ATP}}{\text{Probe}} : \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{15,78}{\text{Probe}} \text{ ng} * 5 = \frac{78,9}{50 \mu\text{l}} \text{ ng}$$

Fortsetzung von Seite 47!

2. Untersuchung

Initialen	7 ⁴⁵	9 ¹⁵	11 ¹⁵	14 ⁰⁰	15 ³⁰
D. D.	7,35	3,99	4,11	1,47	1,19
F. R.	2,12	0,94	0,45	0,45	0,70
E. R.	4,80	1,28	1,96	0,87	2,32

Nüchternspeichel
Tagesspeichel

Alle Angaben in nmol/ml.

Messungen des DrüSENSPEICHELs:

1) Parotisspeichel

<u>I. L.</u>	ATP-Werte (pmol/ml)	Sekretion (μ l/5min)	<u>H. F.</u>	ATP-Werte (pmol/ml)	Sekretion (μ l/5min)
	25,4	300		42,6	
	24,1	210		30,7	
	21,8	400		40,4	160
	18,2	400		54,0	130
	16,2	500			80
	16,2	400		23,7	80
	18,5	250		61,8	130
	13,9	500		30,9	100
	38,7	500			55
	19,8	300		34,5	55
	17,5	400			55
	14,5	300		16,5	55
	13,2	250		15,2	120
	13,2	400		12,3	110

<u>G. K.</u>	<u>ATP-Werte</u> (pmol/ml)	<u>Sekretion</u> (μ l/5min)	<u>M. H.</u>	<u>ATP-Werte</u> (pmol/ml)	<u>Sekretion</u> (μ l/5min)
	73,4	300			50
	32,4	170		150,4	50
	27,1	130		77,7	110
		80		72,7	120
	32,4	200		43,3	100
	62,9	130			65
	47,9	200		84,6	65
	36,0	150		160,3	150
		130			90
		180		74,7	90
		170			90
	48,3	150		75,7	90
	24,9	110			70
	23,1	170		29,7	70
	38,5	150		68,7	150
	24,8	100		49,6	100
	32,1	120			55
		80		91,9	55
	19,2	130			
	39,7	160			
	24,8	180			
	17,2	120			

2) Submandibularisspeichel

ATP-Werte der 1. Meßreihe ($\bar{x} = 11,8$):

11,57	13,05	13,55	11,24	8,59	12,89
-------	-------	-------	-------	------	-------

ATP-Werte der 2. Meßreihe ($\bar{x} = 11,3$):

15,40	12,39	10,58	9,25	10,58	9,92	10,91
-------	-------	-------	------	-------	------	-------

Alle Angaben in pmol/ml.

Herrn Prof. Dr. Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Versuche im biochemischen Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie durchführen zu können. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Distler für die freundliche Unterstützung bei meiner experimentellen Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Peuten, der mir bei der Einführung der Katheter in den Ausführungsgang der Parotis behilflich war, und ganz besonders meinen Kollegen, die dies über sich ergehen ließen. Außerdem möchte ich mich noch einmal bei allen bedanken, die sich für meine Versuche zur Verfügung gestellt haben.

LEBENS LAUF

Geboren am 10.5.1955	in Münchberg als 1. Kind des Lehrers Erwin Hein und seiner Ehefrau Monika
ab September 1961	Besuch der Volksschule in Reinersreuth, Landkreis Hof
September 1965	Übertritt in das naturwissenschaftliche Gymnasium in Münchberg
September 1966	Umzug nach Coburg und Eintritt in das Gymnasium Albertinum
Juni 1975	Abitur
ab Juli 1975	Grundwehrdienst in Amberg
Juni 1976	Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
März 1977	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
September 1978	Zahnärztliche Vorprüfung
Juli 1981	Zahnärztliche Prüfung

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197